

## 明 細 書

薬物を含むナノ粒子およびその製造方法、ならびに当該ナノ粒子からなる非経口投与用製剤

### 技術分野

[0001] 本発明は、脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物を含むナノ粒子に関し、さらに詳細には、脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物のナノ粒子およびその製造方法、ならびに当該ナノ粒子からなる皮膚および粘膜適用、ならびに注射用の非経口投与用製剤に関する。

### 背景技術

[0002] 薬物を経皮・経粘膜投与する目的は、経口投与剤の欠陥である、例えば、(1)消化管からの薬物の吸収が悪く、吸収がばらつき、肝で不活性化される、(2)急激な薬物の吸収で副作用が発現し、特に胃腸管や肝における副作用が強くなる、(3)薬物の徐放効果が得られない、などを改善するためである。

[0003] 薬物の皮膚および粘膜適用に関しては、すでに多くの技術が実用化されている。それらの問題点として、局所作用を目的としたものでは皮膚・粘膜への吸収・分布が不十分であること、皮下・粘膜下組織への浸透が十分でないことなどが挙げられ、また全身への吸収を目的として用いられる場合には、全身への吸収が十分でない薬物が多いことである。

[0004] さらに、薬物の全身投与を目的とした外用剤にあつては、表皮または粘膜で副作用が起きるもの、皮膚・粘膜の代謝酵素で不活性化されて副作用のある物質に変換されるものなどがあり、この場合には、薬物が表皮および粘膜で反応、代謝を受けないで、皮膚組織を通過される必要がある。たとえば、テストステロンの経皮投与剤は広く用いられているが、テストステロンは、皮膚に存在する2, 5-ジハイドロキシナーゼにより脱毛、前立腺がんを起こす活性代謝物に多く代謝されることが知られている。

[0005] 近年、経口投与では不活性化してしまい、注射投与を余儀なくされている生理活性タンパク質、ペプチドについて、経皮・経粘膜投与が試みられているが、吸収率の改善を確保するまでは到っていないのが現状である。

[0006] 生理活性タンパク質の一つとして、比較的低分子で、しかも化学的に安定なインスリンを用いて皮膚、粘膜経由の投与方法について種々の研究が行われているが、その吸収率は、確実なデータでは数パーセント程度にすぎず、皮膚経由の投与ではほとんど吸収されないとされている(非特許文献1)。

[0007] また、生物活性物質をカルシウム含有水難溶性無機物粒子に封入した製剤(特許文献1)、生理活性タンパク質あるいはペプチドと亜鉛イオンとの沈殿物による水不溶性徐放性組成物(特許文献2)などが提案されている。しかしながら、これらの製剤は、薬物の吸収性、あるいは局所刺激等の点で十分なものとは言い難く、未だ実用化に至ったものはない。また、本発明が目的とする脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物を含有するナノ粒子を用いて皮膚、粘膜経由により生体内吸収させようとする技術については、これまで知られていない。

[0008] 特許文献1:国際公開 WO 02/096396号公報

特許文献2:特開2003-081865号公報

非特許文献1:DRUG DELIVERY SYSTEM 今日のDDS 薬物送達システム(医薬ジャーナル)325-331頁、1999年

非特許文献2:臨床薬理(Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.):26(1), p.127-128(1995)

非特許文献3:Yakugaku Zasshi:121(12), p.929-948(2001)

非特許文献4:J. Controlled Release:79, p.81-91(2002)

[0009] 上述したように、経口投与により吸収性が悪い、あるいは不活性化する、副作用が発現するなどの欠陥を有する薬物を、皮膚、粘膜投与に適用することができ、かつ薬物の吸収性に優れ、十分な活性を発揮し、副作用を最小限にする薬剤の開発が望まれている。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0010] したがって本発明は、経口投与によって薬効を発揮できないか、または吸収性、副作用等で欠点を有する薬物、および注射剤、皮膚外用剤として使用されているが、吸収性、副作用などの点で改善を要する薬物について、皮膚および粘膜経由の投与方法により局所も含め生体内への吸収性に優れ、高いバイオアベイラビリティを

発揮し得る技術を提供することを課題とする。

[0011] かかる課題を解決するべく、本発明者らは鋭意検討した結果、ナノテクノロジーを応用し、赤血球よりも遥かに小さい特殊なナノ粒子を利用し、それに薬物を含有させることに成功し、かくして得られたナノ粒子を、皮膚ならびに粘膜経路による投与を行った場合、ナノ粒子に含有された薬物の生体内への高い吸収性が得られ、バイオアベイラビリティに優れるものであることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0012] 本発明者らは、先に、生理活性タンパク質またはペプチドのナノ粒子を発明し、特許出願を行っている(特願2003-312031号)。本発明者らは、さらに脂溶性薬物およびタンパク質、ペプチド以外の水溶性薬物について、ナノ粒子の作製に成功し、本発明を完成させるに至った。

#### 課題を解決するための手段

[0013] したがって、本発明は、全身投与および局所投与を目的とした皮膚または粘膜投与により優れた吸収性、バイオアベイラビリティを有する、脂溶性薬物または水溶性薬物を含有するナノ粒子を提供する。また、本発明のナノ粒子は、注射用剤としても有利に使用できる。

より具体的には、本発明は、

- (1) 脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物を含有する一次ナノ粒子を、2価または3価の金属塩に作用させることから成なる薬物含有ナノ粒子、
- (2) 脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物を含有する一次ナノ粒子を、2価または3価の金属塩と作用させることにより二次ナノ粒子とし、当該二次ナノ粒子に1価ないし3価の塩基性塩を作用させることからなる薬物含有ナノ粒子、
- (3) 一次ナノ粒子が、脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物、陰イオン残基を持つ中長鎖有機化合物および界面活性剤とを作用させることにより作製されることからなる上記(1)または(2)に記載の薬物含有ナノ粒子、
- (4) 陰イオン残基を持つ中長鎖有機化合物が、炭素数6〜24の脂肪酸またはその塩である上記(3)に記載の薬物含有ナノ粒子、
- (5) 炭素数6〜24の脂肪酸が、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸などの不飽和脂肪酸;ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸などの飽和脂肪酸から選択されるものであ

る上記(4)に記載の薬物含有ナノ粒子、

(6) 2価または3価の金属塩が、カルシウム塩、亜鉛塩、鉄塩または銅塩である上記(1)または(2)に記載の薬物含有ナノ粒子、

(7) 1価ないし3価の塩基性塩が、炭酸水素塩、リン酸水素塩、炭酸塩、リン酸塩、シュウ酸塩、乳酸塩および尿酸塩から選択させるものである上記(2)に記載の薬物含有ナノ粒子、

(8) 水溶性薬物の脂溶性化が、水溶性薬物と2価または3価の金属イオンとの接触、水溶性薬物と酸性または塩基性多糖体との接触、水溶性薬物を溶解した溶液のpHの調整またはイオン強度の変化のいずれかの手段煮より行われる上記(1)または(2)に記載の薬物含有ナノ粒子、

(9) 水溶性薬物と接触させる2価または3価の金属イオンが、亜鉛イオン、カルシウムイオン、鉄イオンおよび銅イオンでから選択されるものである上記(8)に記載の薬物含有ナノ粒子、

(10) 界面活性剤が、グリセリン、レシチン、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレート(Tween80)、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート(Tween20)、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノステアレート(Tween60)、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノパルミテート(Tween40)、ポリオキシエチレン(20)ソルビタントリオレート(Tween85)、ポリオキシエチレン(8)オクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン(20)コレステロールエステル、脂質-ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油および脂肪酸-ポリエチレングリコール共重合体から選択される1種または2種以上のものである上記(3)または(9)に記載の薬物含有ナノ粒子、

(11) 脂溶性薬物または水溶性薬物が、分子量が1000以下であって生理活性を有し、かつヒトに投与することができる化学物質である上記(1)〜(10)のいずれかに記載の薬物含有ナノ粒子、

(12) 脂溶性薬物が、水に対して溶けにくい〜ほとんど溶けないの範囲の溶解性であって、かつ有機溶媒に溶ける薬物である上記(11)に記載の薬物含有ナノ粒子、

(13) 脂溶性薬物が、ステロイドホルモン、免疫抑制・調節薬、抗癌薬、抗生物質、化学療法薬、抗ウイルス薬、非ステロイド性抗炎症薬、抗精神病薬、カルシウム拮抗薬

、降圧薬、プロスタグランジン系薬および脂溶性ビタミンから選択されるものである上記(11)または(12)に記載の薬物含有ナノ粒子、

(14)脂溶性薬物が、エナント酸テストステロン、プロピオン酸テストステロン、テストステロン、エストラジオール、吉草酸エストラジオール、安息香酸エストラジオール、酢酸デキサメタゾン、ベタメタゾン、ジプロピオン酸ベタメタゾン、吉草酸ベタメタゾン、酢酸プレドニゾン、シクロスポリン、タクロリムス、パクリタキセル、塩酸イリノテカン、シスプラチン、メントレキセート、カルモフル、テガフル、ドキシソルビシン、クラリスロマイシン、アズトレオナム、セフニジル、ナリジクス酸、オフロキサシン、ノルフロキサシン、ケトプロフェン、フルルビプロフェン、フルルビプロフェンアキセチル、クロルプロマジン、ジアゼパム、ニフェジピン、塩酸ニカルジピン、ベシル酸アムロジピン、カンデサルタンシレキセチル、アシクロビル、ビダラビン、エファビレンツ、アルプロスタジル、ジノプロストン、ユビデカレノン、ビタミンA(レチノール)、ビタミンD、ビタミンEおよびビタミンKから選択されるものである上記(11)～(13)のいずれかに記載の薬物含有ナノ粒子、

(15)水溶性薬物が、2価または3価の金属イオンと結合して脂溶性化される薬物である上記(11)に記載の薬物含有ナノ粒子、

(16)水溶性薬物が、水溶性のステロイドホルモン、免疫抑制・調節薬、抗癌薬、抗生物質、化学療法薬、抗ウイルス薬、非ステロイド性抗炎症薬、抗精神病薬、降圧薬、プロスタグランジン系薬およびビタミンから選択されるものである上記(11)または(15)に記載の薬物含有ナノ粒子、

(17)水溶性薬物が、リン酸ベタメサゾン、リン酸デキサメタゾン、リン酸ヒドロコルチゾン、リン酸プレドニゾン、コハク酸プレドニゾン、コハク酸ヒドロコルチゾン、バンコマイシン、ビンクリスチン、ビンプラスチン、コハク酸クロラムフェニコール、ラタモキシフ、セフピロム、カルモナム、リン酸クリンダマイシンおよびアバカビルから選択されるものである上記(11)、(15)または(16)のいずれかに記載の薬物含有ナノ粒子、

(18)脂溶性薬物が、エナント酸テストステロン、シクロスポリン、吉草酸ベタメタゾン、ユビデカレノン、ビタミンA(レチノール)であり、水溶性薬物がリン酸ベタメサゾンである上記(11)に記載の薬物含有ナノ粒子、

(19)粒子の直径が1ー150nmである上記(1)ー(18)のいずれかに記載の薬物含有ナノ粒子、  
を提供するものである。

[0014] さらに本発明は、

(20)上記(1)ー(19)のいずれかに記載の薬物含有ナノ粒子を含有する皮膚または粘膜適用型外用剤、

(21)外用剤が、軟膏剤、ゲル剤、舌下錠、口腔錠剤、液剤、口腔・下気道用噴霧剤、吸引剤、懸濁剤、ハイドロゲル剤、ローション剤、パップ剤および貼付剤から選択される上記(20)に記載の外用剤、

(22)上記(1)ー(19)のいずれかに記載の薬物含有ナノ粒子を含有する注射用剤、

(23)脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物、陰イオン残基を持つ中長鎖有機化合物および界面活性剤を有機溶媒または含水有機溶媒に溶解し、この溶液を水に分散させることにより一次ナノ粒子を作製し、当該一次ナノ粒子含有溶液に2または3価の金属塩を作用させることを特徴とする薬物含有ナノ粒子の製造方法、

(24)脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物、陰イオン残基を持つ中長鎖有機化合物および界面活性剤を有機溶媒または含水有機溶媒に溶解し、この溶液を水に分散させることにより一次ナノ粒子を作製し、当該一次ナノ粒子含有溶液に2または3価の金属塩を作用させることにより二次ナノ粒子を作製し、当該二次ナノ粒子に1価ないし3価の塩基性塩を作用させることを特徴とする薬物含有ナノ粒子の製造方法、

(25)有機溶媒が、アセトン、エタノール、プロパノールおよびブタノールから選択される1種または2種以上である上記(23)または(24)に記載の製造方法、

(26)水溶性薬物の脂溶性化が、水溶性薬物と2価または3価の金属イオンと接触させることからなる上記(23)または(24)に記載の製造方法、

を提供するものである。

### 発明の効果

[0015] 本発明が提供するナノ粒子は、そこに含有される脂溶性薬物および水溶性薬物を、皮膚または粘膜経路により生体内吸収させるものであり、また、注射投与によっても

優れた徐放性、ターゲッティングを示すものである。したがって、これまで十分に達成されていなかった脂溶性薬物、水溶性薬物の経皮または経粘膜による生体内吸収を可能にする画期的な効果を有し、高吸収性、徐放性の脂溶性・水溶性薬物を含有する外用剤、注射剤が提供される。また、本発明のナノ粒子を経皮投与すると、表皮から深部まで浸透し、真皮、皮下組織に高濃度に分布し、よって皮膚に近い関節、腱鞘、筋肉などの疾患に極めて有用である。粘膜下組織に対しても同様のことがみられ、さらに種々の疾患に応用することが可能である。また、物理化学的に不安定な薬物を本発明のナノ粒子とすることにより、極めて安定化することができる。したがって、本発明のナノ粒子は、医薬品、医薬部外品、化粧品として使用することができる。

#### 発明を実施するための最良の形態

- [0016] 本発明は、上記するように、脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物を含有する一次ナノ粒子を、2価または3価の金属塩を作用させることからなる薬物含有ナノ粒子(二次ナノ粒子)、および脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物を含有する一次ナノ粒子を2価または3価の金属塩と作用させることにより二次ナノ粒子とし、当該二次ナノ粒子に1価ないし3価の塩基性塩を作用させることからなる薬物含有ナノ粒子(三次ナノ粒子)、ならびにそれらのナノ粒子の製造方法、さらにそれらのナノ粒子を含有する皮膚または粘膜適用型外用剤および注射用剤である。
- [0017] 本発明のナノ粒子は、その直径は1〜200nm程度であり、好ましくは5〜150nm程度である。かかる粒子径は、含有させる薬物と中長鎖有機化合物との配合比率、界面活性剤の添加量、1価ないし3価の塩基性塩の添加量、使用する溶媒量、攪拌の強度などによって調整することができ、直径5〜500nm程度の粒子を作製することができる。また、界面活性剤の量が多くなるほど粒径は大きくなるが、少なすぎても粒子間の凝集や大きな粒子が形成される。粒子径の測定は、光散乱法あるいは電子顕微鏡下で測定することができる。
- [0018] 本発明が提供するナノ粒子に含有される脂溶性薬物としては、水に対して溶けにくい〜ほとんど溶けないの範囲の溶解性であって、かつ有機溶媒に溶ける薬物であればいずれでも良く、例えばステロイドホルモン、免疫抑制・調節薬、抗癌薬、抗生物質、化学療法薬、抗ウイルス薬、非ステロイド性抗炎症薬、抗精神病薬、カルシウム

拮抗薬、降圧薬、プロスタグランジン系薬および脂溶性ビタミンから選択されるものである。さらに具体的にはエナント酸テストステロン、プロピオン酸テストステロン、テストステロン、エストラジオール、吉草酸エストラジオール、安息香酸エストラジオール、酢酸デキサメタゾン、ベタメタゾン、ジプロピオン酸ベタメタゾン、吉草酸ベタメタゾン、酢酸プレドニゾン、シクロスポリン、タクロリムス、パクリタキセル、塩酸イリノテカン、シスプラチン、メサトレキセート、カルモフル、テガフル、ドキシソルビシン、クラリスロマイシン、アズトレオナム、セフニジル、ナリジクス酸、オフロキサシン、ノルフロキサシン、ケトプロフェン、フルルビプロフェン、フルルビプロフェンアキセチル、クロルプロマジン、ジアゼパム、ニフェジピン、塩酸ニカルジピン、ベシル酸アムロジピン、カンデサルタンシレキセチル、アシクロビル、ビダラビン、エファビレンツ、アルプロスタジル、ジノプロストン、ユビデカレノン、ビタミンA(レチノール)、ビタミンD、ビタミンEおよびビタミンKなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0019] 上記薬物が塩、エステル、立体異性体、光学異性体、溶媒和物などを有する場合はそれらの全てを包含する。

[0020] 本発明が提供するナノ粒子に含有される水溶性薬物としては、2価または3価の金属イオンと結合して脂溶性化される薬物であればいずれでも良く、例えば水溶性のステロイドホルモン、免疫抑制・調節薬、抗癌薬、抗生物質、化学療法薬、抗ウイルス薬、非ステロイド性抗炎症薬、抗精神病薬、降圧薬、プロスタグランジン系薬およびビタミンから選択されるものであり、分子内にリン酸基、カルボキシル基または硫酸基を有する薬物が特に好ましい。さらに具体的にはリン酸ベタメタゾン、リン酸デキサメタゾン、リン酸プレドニゾン、コハク酸プレドニゾン、コハク酸ヒドロコルチゾン、バンコマイシン、ビンクリスチン、ビンプラスチン、コハク酸クロラムフェニコール、ラタモキシフ、セフピロム、カルモナム、リン酸クリンダマイシンおよびアバカビルなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0021] 上記薬物が塩、エステル、立体異性体、光学異性体、溶媒和物などを有する場合はそれらの全てを包含する。

[0022] 本発明の一次ナノ粒子を製造する場合において、脂溶性薬物または水溶性薬物の場合は脂溶性化する必要がある。水溶性薬物を脂溶性化する手段として最も好ま



しいのは、水溶性薬物と沈殿物を形成する2価または3価の金属イオンを使用することである。そのような2価または3価の金属イオンとしては、酢酸亜鉛、塩化亜鉛、硫酸亜鉛などの亜鉛塩による亜鉛イオン；炭酸カルシウム、塩化カルシウム、硫酸カルシウムなどのカルシウム塩によるカルシウムイオン；塩化鉄、硫化鉄などの鉄塩による鉄イオン；塩化銅、硫酸銅などの銅塩による銅イオン等を挙げることができ、なかでも亜鉛イオンを好ましく使用することができる。

[0023] この場合の水溶性薬物と2価または3価の金属イオンとの配合比は特に限定されず、両物質が結合することにより沈殿物を生じるに十分な比率であればよい。例えば、亜鉛イオンの場合、水溶性薬物と亜鉛塩とを重量比で10:1〜1:10程度とするのがよい。その他の脂溶性化方法として、コンドロイチン硫酸ナトリウム、ヒアルロン酸、キトサンなどの酸性または塩基性多糖体と接触させること、あるいは水溶性薬物を溶解した溶液のpH調節、イオン強度の変化などにより行うことも可能である。なお、脂溶性薬物はそのまま使用することができる。

[0024] 本発明の一次ナノ粒子を製造するためには、カルボキシル基、リン酸基、硫酸基などの陰イオン残基を持つ有機化合物が必要であり、それらを有していればいずれでもよいが、なかでもカルボキシル基を有する中長鎖有機化合物が好ましい。そのような陰イオン残基を持つ中長鎖有機化合物としては炭素数6〜24の不飽和または飽和脂肪酸あるいはその塩が好ましく、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸などの不飽和脂肪酸；ラウリン酸、ミスチン酸、パルミチン酸などの飽和脂肪酸が挙げられ、オレイン酸、ミスチン酸が特に好ましい。これらの中長鎖有機化合物は粉末である場合にはそのまま加えることが可能であるが、水、有機溶媒または含水有機溶媒に溶解して使用するのが好ましい。そのような有機溶媒としては、アセトン、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノールなどの低級アルコールが使用でき、なかでもアセトン、エタノールが好ましい。なお、脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物と中長鎖有機化合物との配合重量比は、1:30〜1:0.03程度とするのが好ましい。

[0025] この一次ナノ粒子を製造する段階で、微細な粒子を含有する良好な均一状態を得るために、攪拌機、超音波発振器を使用し、また、フレンチプレッシャー、マントゴーリーなどを使用し、圧力を強めることにより微細なナノ粒子としての一次ナノ粒子が作

製される。

- [0026] 本発明の一次ナノ粒子を製造するに際しては、生成したナノ粒子同士の凝集を避けるために、適量の界面活性剤を添加するのが好ましく、その配合量はナノ粒子同士が凝集しない程度で適宜選択することができ、中長鎖有機化合物に対してモル比で0.3〜0.01程度使用するのがよい。そのような界面活性剤としては、グリセリン、レシチン、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレート(Tween80)、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート(Tween20)、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノステアレート(Tween60)、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノパルミテート(Tween40)、ポリオキシエチレン(20)ソルビタントリオレート(Tween85)、ポリオキシエチレン(8)オクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン(20)コレステロールエステル、脂質-ポリエチレングリコール、脂肪酸-ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、脂肪酸-ポリエチレングリコール共重合体などの非イオン性界面活性剤を使用することができる。これらの界面活性剤は1種または2種以上を選択して使用することができる。なかでも、グリセリン、レシチン、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレート(Tween80)、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート(Tween20)、脂肪酸-ポリエチレングリコール共重合体が好ましく、この場合の脂肪酸としては、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸などの不飽和脂肪酸；ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸などの飽和脂肪酸を挙げることができる。
- [0027] さらに植物油を添加することもできる。この場合に使用される植物油としては、大豆油、ゴマ油、トウモロコシ油、オリーブ油、各種サラダ油等の植物油を好ましく使用することができる。
- [0028] 本発明のナノ粒子は、上述により得られる一次ナノ粒子を2価または3価の金属塩と作用させることにより得られる二次ナノ粒子、およびこの二次ナノ粒子を1価ないし3価の塩基性塩と作用させることにより得られる三次ナノ粒子からなる。
- [0029] 使用される2価または3価の金属塩としては、塩化カルシウム、酢酸カルシウム、硫酸カルシウムなどのカルシウム塩；酢酸亜鉛、塩化亜鉛、硫酸亜鉛などの亜鉛塩；塩化鉄、硫化鉄などの鉄塩；または塩化銅、硫化銅などの銅塩であり、なかでもカルシウム塩、特に塩化カルシウムが好ましい。金属塩の配合量は一概に限定し得ないが

、有効成分となる薬物に対し重量比で5〜0.01程度が好ましい。

[0030] また、三次ナノ粒子を得るための1価ないし3価の塩基性塩としては、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カリウムなどの炭酸水素塩；リン酸水素ナトリウム、リン酸水素カリウムなどのリン酸水素塩；炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸カルシウムなどの炭酸塩；リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、リン酸カルシウムなどのリン酸塩；シュウ酸ナトリウム、シュウ酸カリウム、シュウ酸カルシウムなどのシュウ酸塩；乳酸ナトリウム、乳酸カリウム、乳酸カルシウムなどの乳酸塩、尿酸ナトリウム、尿酸カリウム、尿酸カルシウムなどの尿酸塩などであり、なかでも脂溶性薬物の場合は炭酸水素塩、炭酸塩が好ましく、脂溶性化された水溶性薬物の場合は炭酸塩とくに炭酸ナトリウムが好ましい。塩基性塩の配合量は一概に限定し得ないが、上記2価または3価の金属塩に対しモル比で1.0〜0.05程度であるのが好ましい。

[0031] 以下に、本発明が提供するナノ粒子の製造方法について説明する。

まず、脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物と、陰イオン残基を持つ中長鎖有機化合物と界面活性剤とを有機溶媒または含水有機溶媒に溶解し、この溶液を多量の水に分散させ、この溶液を1〜30分間程度攪拌することにより一次ナノ粒子が作製される。かくして作製された一次ナノ粒子を含有する溶液に、2価または3価の金属塩を加え、1〜30分間攪拌して二次ナノ粒子を作製する。次いで、かくして得られた二次ナノ粒子の溶液に1価ないし3価の塩基性塩を加え、1分〜24時間攪拌することにより三次ナノ粒子を得ることができる。なお、水溶性薬物を脂溶性化する方法は、水溶性薬物を酸性、塩基性または中性の水に溶解し、その溶液に2価または3価の金属イオンを加えることにより得られる。

[0032] かくして製造された本発明の脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物を含有する二次ナノ粒子および三次ナノ粒子の溶液を、凍結乾燥、減圧乾燥、噴霧乾燥等を行うことにより溶媒を除去し、製剤用組成物として、適宜製剤基剤、添加剤等を使用することにより、所望の非経口投与用製剤である皮膚・粘膜適用型外用剤または注射用剤を調製することができる。

[0033] 本発明は、また、そのような皮膚・粘膜適用型外用剤または注射用剤を提供するものである。そのような外用剤としては、全身および局所投与・治療を目的として局所へ

塗布、貼付、滴下、噴霧などの形態で投与しうるものであり、具体的には、軟膏剤、ゲル剤、舌下錠、口腔錠剤、液剤、口腔・下気道用噴霧剤、吸引剤、懸濁剤、ハイドロゲル剤、ローション剤、パップ剤、貼付剤等を挙げることができる。液剤としては点鼻剤、点眼剤として好ましい。また、皮膚または粘膜への塗布、下気道への噴霧などが有効な投与形態である。注射用剤としては、静脈注射、皮下注射、筋肉注射のいずれの投与形態も可能であり、それぞれの薬物の特性によって選択される。

- [0034] これらの外用剤、注射剤の調製に使用される基剤、その他の添加剤成分としては、製剤学的に外用剤、注射剤の調製に使用されている基剤、成分を挙げることができる。具体的には、ワセリン、プラスチックベース、パラフィン、流動パラフィン、軽質流動パラフィン、サラシミツロウ、シリコン油などの油脂性基剤；水、注射用水、エタノール、メチルエチルケトン、綿実油、オリーブ油、落花生油、ゴマ油などの溶剤；ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコールなどの非イオン性界面活性剤；ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC)、キサンタンガム、トラガントガム、アラビアガム、ゼラチン、アルブミンなどの増粘剤；ジブチルヒドロキシトルエンなどの安定化剤；グリセリン、1, 3-ブチレングリコール、プロピレングリコール、尿素、ショ糖、エリスリトール、ソルビトールなどの保湿剤；パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸ブチル、デヒドロ酢酸ナトリウム、p-クレゾールなどの防腐剤であり、剤型に応じて適宜選択して使用することができる。また、点鼻剤の場合、ヒドロキシプロピルセルロースなどの経鼻吸収促進剤を配合すると好ましい。さらに、ハイドロゲル剤とするには、カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC)、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどのゲル化剤を使用する。

- [0035] 例えば、本発明のナノ粒子を有効成分として含有する軟膏剤の場合には、基剤等の成分としてワセリンを使用し、懸濁安定化するために0.05〜0.5%のカルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC)と一緒に使用するのがよい。

実施例

[0036] 本発明を、以下の実施例、試験例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0037] 実施例1: 二次ナノ粒子の作製—界面活性剤の影響

10mgのオレイン酸ナトリウムを水0.1mLに添加し、バス型超音波発生器でミセルとして完全に溶解した。その後、所定量のTween80およびエタノールに溶解したエナント酸テストステロン1mgまたはシクロスポリンA1mgを混合し、10分間超音波発生器を用いて均一にした。次いで、所定量の塩化カルシウム水溶液を加え30分間攪拌することによりエナント酸テストステロンまたはシクロスポリンAを含有する二次ナノ粒子を作製した。こうしてえられた薬物含有の溶液を10,000rpm/10分間遠心し、その上清中のエナント酸テストステロンおよびシクロスポリンAの含有量をHPLCによって定量した。結果を表1および表2に示した。

[0038] カルシウムおよびTween量(重量比)がエナント酸テストステロン(TE)含有粒子形成に及ぼす影響

[0039] [表1]

	[Ca/オレイン酸Na]	Tween80/オレイン酸Na(重量比)			
		0	0.2	0.5	1.0
上清中の TE量(%)	1	1.6	85	92	91
	3	0.5	90	93	93
	5	1.2	94	95	88

[0040] カルシウムおよびTween量(重量比)がシクロスポリンA(CYA)含有粒子形成に及ぼす影響

[0041] [表2]

	[Ca/オレイン酸Na]	Tween80/オレイン酸Na(重量比)			
		0	0.2	0.5	1.0
上清中の CYA量(%)	1	1.1	49	84	65
	3	0.8	81	87	94
	5	0.8	58	65	86

[0042] 表1および表2に示した結果から、Tween80を混合しない場合には、大きな粒子や凝集体が形成され、薬物が沈殿してしまったが、2mg以上のTween80を混合することで、薬物を含有した小さな粒子が形成されていることが判明した。また、カルシウム

量の変化によっては薬物の含有量は影響されなかった。

[0043] 実施例2: 二次ナノ粒子の作製

10mgのオレイン酸ナトリウムを水0.1mLに添加し、バス型超音波発生器でミセルとして完全に溶解した。その後、所定量のTween80およびエタノールに溶解した吉草酸ベタメサゾン1mgを混合し、10分間超音波照射した。次いで、1M塩化カルシウム水溶液33 $\mu$ Lを添加し、30分間攪拌することにより吉草酸ベタメサゾンを含む二次ナノ粒子を作製した。こうして得られた薬物含有の溶液を10,000rpm/10分間遠心し、その上清中の吉草酸ベタメサゾンの含有量をHPLCによって定量した。結果を表3に示した。

[0044] 吉草酸ベタメサゾン(BV)の粒子化

[0045] [表3]

	Tween80 / オレイン酸 Na (重量比)				
	0	2.0	4.0	6.0	8.0
上清中のBV量(%)	14	89	90	91	89

[0046] 実施例3: 界面活性剤と粒径の関係

10mgのオレイン酸ナトリウムに、所定量の脂質-PEG (ホスファチジルエタノールアミン-PEG (MW:2000)、日本油脂製) またはTween80を混合し、超音波発生器を用いて均一にしてから、1M塩化カルシウム水溶液33 $\mu$ Lを添加しその粒径を測定した。結果を表4に示した。

[0047] 界面活性剤量が界面活性剤/オレイン酸粒子の粒径に及ぼす影響

[0048] [表4]

	界面活性剤	界面活性剤 / オレイン酸 Na (重量比)							
		0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.6	0.8	1.0
粒径 (nm)	脂質-PEG	凝集	160	123	133	151	163	196	209
	Tween80	凝集	ND	99	ND	107	126	ND	161

ND: 測定せず

[0049] 表4に示した結果より、界面活性剤の量が多くなるほどその粒径が大きくなるが、少なすぎても凝集や大きな粒子が形成され、最小の粒径を形成する混合比が存在することが判明した。

[0050] 実施例4: 三次ナノ粒子の作製—金属塩／塩基性塩の種類の影響

10mgのオレイン酸ナトリウムを水0.1mLに添加し、バス型超音波発生器でミセルとして完全に溶解した。その後、6mgのTween80およびエタノールに溶解したシクロスポリンA1mgを混合し、10分間超音波発生器を用いて均一にした。次いで、1M塩化カルシウムあるいは1M塩化亜鉛をオレイン酸ナトリウムに対し等モル量となるように添加し、30分間攪拌することによりシクロスポリンAを含有する二次ナノ粒子を作製した。次いで、この二次ナノ粒子を含有する溶液に金属塩と等モル量の炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウムあるいはリン酸二水素ナトリウムを添加し、1時間攪拌することにより薬物を含有する三次ナノ粒子を作製した。その後、10,000rpm／10分間遠心し、その上清中のシクロスポリンAの含有量をHPLCにより定量した。結果を表5に示した。

[0051] 種々の金属塩および塩基性塩による三次ナノ粒子形成

[0052] [表5]

	金 属 塩	塩 基 性 塩			
		なし	NaHCO <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
		-	1M, 33 $\mu$ L	1M, 33 $\mu$ L	1M, 33 $\mu$ L
上 清 中 の C Y A 量 ( % )	CaCl <sub>2</sub> (1M, 33 $\mu$ L)	97	93	88	62
	ZnCl <sub>2</sub> (1M, 33 $\mu$ L)	46	48	47	76

オレイン酸Na:10mg、Tween80:6mg、シクロスポリンA(CYA):1mg

[0053] 表5に示した結果からも判明するように、塩化亜鉛を添加した場合に比較して塩化カルシウムを添加した時のほうが、小さくて安定なシクロスポリンA含有ナノ粒子が調製できることが判明した。また、塩化亜鉛を添加した場合には、塩基性塩としてリン酸塩のほうが炭酸塩に比較して小さくて安定なシクロスポリンA含有ナノ粒子が調製でき、逆に、塩化カルシウムを添加した場合には、塩基性塩として炭酸塩のほうがリン酸塩に比較して小さくて安定なシクロスポリンA含有ナノ粒子が調製できることが判明した。

[0054] 実施例5: 三次ナノ粒子の作製—塩基性塩の影響

10mgのオレイン酸ナトリウムを水0.1mLに添加し、バス型超音波発生器でミセルとして完全に溶解した。その後、5mgのTween80およびエタノールに溶解したエナ

ント酸テストステロン1mgまたはシクロスポリンA1mgを混合し、10分間超音波発生器を用いて均一にした。次いで、塩化カルシウムをオレイン酸ナトリウムに対し3倍モル比となるように添加し、30分間攪拌することによりエナント酸テストステロンまたはシクロスポリンAを含有する二次ナノ粒子を作製した。次いで、この二次ナノ粒子を含有する溶液に所定量の炭酸水素ナトリウムを添加し、1時間攪拌することにより薬物を含有する三次ナノ粒子を作製した。その後、10,000rpm/10分間遠心し、その上清中のエナント酸テストステロンおよびシクロスポリンAの含有量をHPLCにより定量した。結果を表6および表7に示した。

[0055] 炭酸水素ナトリウム量の粒子形成への影響(エナント酸テストステロン、TE)

[0056] [表6]

	[NaHCO <sub>3</sub> ]/[Ca]										
	0	0.03	0.1	0.2	0.3	0.5	0.75	1.0	2.0	3.0	5.0
上清中の TE (%)	92	88	89	86	83	82	80	73	63	56	46

[0057] 炭酸水素ナトリウム量の粒子形成への影響(シクロスポリンA、CYA)

[0058] [表7]

	[NaHCO <sub>3</sub> ]/[Ca]										
	0	0.03	0.1	0.2	0.3	0.5	0.75	1.0	2.0	3.0	5.0
上清中の CYA (%)	64	71	73	55	48	67	55	46	49	61	34

[0059] 表6および表7に示した結果より、カルシウムに対する炭酸水素ナトリウムの量を増加させるほど上清中の薬物の量は減少した。これは、過剰に存在する炭酸とカルシウムが反応し、炭酸カルシウムが形成され、その沈殿物と作製されたナノ粒子が共沈したためと思われる。

[0060] 実施例6: 三次ナノ粒子の作製

実施例5において薬物をエナント酸テストステロンとし、炭酸水素ナトリウムの代わりにリン酸水素二ナトリウム(塩化カルシウムに対し0.5倍モル量)を使用した以外は実施例5と同様の操作を行うことにより、リン酸カルシウムにより被覆されたエナント酸テストステロンを含有する三次ナノ粒子を作製した。



## [0061] 実施例7: 三次ナノ粒子の作製—界面活性剤の影響—安定性

10mgのオレイン酸ナトリウムを水0.1mLに添加し、バス型超音波発生器でミセルとして完全に溶解した。その後、界面活性剤であるTween80、ポリオキシエチレンコレステリルエーテル(CS-20、日本エマルジョン製)またはPEG-オレイン酸(日本油脂製)の所定量およびエタノールに溶解したシクロスポリンA1mgを混合し、10分間超音波発生器を用いて均一にした。次いで、1M塩化カルシウム水溶液33 $\mu$ L、および1M炭酸水素ナトリウム水溶液16.5 $\mu$ Lを順次攪拌しながら添加し、その後1時間攪拌することにより、シクロスポリンAを含有する三次ナノ粒子を作製した。その後、10,000rpm/10分間遠心し、その上清中の粒子懸濁液を水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩(PBS)、ウシ胎児血清(FBS)中に1:9の体積比で添加し、550nmでの吸収値を測定することにより、各液中における安定性を評価した。結果を表8に示した。

[0062] 各溶液中でのナノ粒子の分散安定性(3時間後の550nmでの濁度変化)

[0063] [表8]

		Tween80/オレイン酸 Na (重量比)			
		0.2	0.4	0.6	1.0
3 時間後の吸収値 (濁度変化) $\Delta Abs_{550nm}(0-3Hr)$	H <sub>2</sub> O	0.09	0.02	0.15	0.00
	生理食塩水	0.02	0.00	0.06	0.00
	PBS	0.01	0.03	0.04	0.00
	FBS	0.01	0.03	0.00	0.13
		CS-20/オレイン酸 Na (重量比)			
		0.2	0.4	0.6	1.0
3 時間後の吸収値 (濁度変化) $\Delta Abs_{550nm}(0-3Hr)$	H <sub>2</sub> O	0.04	0.59	0.91	0.67
	生理食塩水	0.02	0.08	0.13	0.04
	PBS	0.02	0.04	0.06	0.03
	FBS	0.03	0.07	0.26	0.41
		PEG-オレイン酸/オレイン酸 Na (重量比)			
		0.2	0.4	0.6	1.0
3 時間後の吸収値 (濁度変化) $\Delta Abs_{550nm}(0-3Hr)$	H <sub>2</sub> O	0.41	0.40	0.40	0.72
	生理食塩水	0.22	0.17	0.13	0.40
	PBS	0.06	0.20	0.16	0.26
	FBS	0.02	0.03	0.23	0.49

[0064] 表8に示した結果より、CS-20およびPEG-オレイン酸においてもTween80と同様にナノ粒子が調製できたが、Tween80を使用して調製されたナノ粒子が各液中

で最も安定であった。

[0065] また、本実施例の各調製段階における粒子の粒径を測定した。その結果を下記表9に示した。それによると、二次ナノ粒子、三次ナノ粒子ともに数100nmの粒子が得られることが判明した。

[0066] ナノ粒子径の変化

[0067] [表9]

	オレイン酸 Na + Tween 80	Tween 80 + CaCl <sub>2</sub>	Tween 80 + CaCl <sub>2</sub> + NaHCO <sub>3</sub>
粒子径 (nm)	ND	80	90

ND:測定せず

[0068] 実施例8:三次ナノ粒子の作製—マウス経皮吸収試験

10mgオレイン酸ナトリウム、シクロスポリンA1mg、Tween80 4mg、1M塩化カルシウム水溶液33  $\mu$ Lおよび1M炭酸水素ナトリウム水溶液16.5  $\mu$ Lを用いて、実施例5と同様の操作を行ってシクロスポリンA含有の三次ナノ粒子を作製した。こうして得られたナノ粒子を含有する溶液を3,500rpmで遠心することにより炭酸カルシウム沈殿を除去し、上清をCentriprep (YM-50、アミコン製)で濃縮して、シクロスポリンA含有の三次ナノ粒子を得た。

[0069] この粒子中のシクロスポリンA量をHPLCにより定量し、7週齢雌ddyマウスの脱毛した背中の皮膚にシクロスポリンA量として2mg/匹となるように粒子懸濁液(25%グリセリン水溶液)を塗布した。また、同量の粒子の水懸濁液(グリセリンなし)を皮下注射投与した。対照例として、同量のシクロスポリンA(25%グリセリン/50%エタノール水溶液)を塗布し、投与後1、3、24時間後に全採血を行い、FPIA法により血漿中に含まれるシクロスポリンAを定量した。結果を表10に示した。

[0070] マウス皮膚へのシクロスポリンA(CYA)封入粒子を塗布した後の血中CYA濃度の推移

[0071] [表10]

	血中CYA濃度(ng/mL)		
	1時間後	3時間後	24時間後
経皮投与(CYA封入粒子)	479	2520	1160
皮下投与(CYA封入粒子)	2725	3240	2450
経皮投与(対照:CYAのみ)	88	1745	457

[0072] 表10に示した結果から判るように、本発明のナノ粒子を塗布した場合は、シクロスポリンAのみを塗布した場合に比べ、高い血中濃度を示すと同時に徐放性を示し、粒子化することでシクロスポリンAが経皮吸収されやすくなっている。また、本発明のナノ粒子を皮下注射投与した場合でも、24時間後でも高い血中濃度が維持されており、吸収性、徐放性に優れていた。

[0073] 実施例9: 三次ナノ粒子の作製—界面活性剤、脂肪酸、溶媒の使用量の影響

所定量のアセトン中に、エナント酸テストステロン10mg、所定量のミリスチン酸およびTween80を溶解し、その溶液を水中に添加、攪拌することによりエナント酸テストステロン含有の一次粒子を得た。この粒子懸濁液中に1M塩化カルシウム水溶液(ミリスチン酸に対し等モル量)を添加し30分攪拌して二次粒子を作製した。次いで、この溶液中へ1M炭酸水素ナトリウム(カルシウムに対し0.2倍モル量)を添加し1～12時間攪拌した。Tween80量、ミリスチン酸量、アセトン量を適宜変えながら調製して得た三次ナノ粒子含有溶液を10,000rpmで10分間遠心し、上清中に含まれる粒子の粒径、エナント酸テストステロンの量を測定した。結果を表11～13に示した。

[0074] Tween量が粒子形成に及ぼす影響

[0075] [表11]

	Tween80/TE (重量比)				
	0	0.2	0.4	0.6	1.0
上清中のTE量(%)	2	73	96	92	103
粒径(nm)	凝集	273	231	209	229

エナント酸テストステロン(TE):10mg、ミリスチン酸:0.5mg、アセトン:360 $\mu$ L

[0076] ミリスチン酸量が粒子形成に及ぼす影響

[0077] [表12]

	ミリスチン酸/TE (重量比)				
	0	0.05	0.1	0.2	0.4
上清中のTE量 (%)	42	72	79	64	50
粒径 (nm)	凝集	231	265	279	268

エナント酸テストステロン(TE):10mg、Tween80:0.5mg、アセトン:3270  $\mu$ L

[0078] アセトン量が粒子形成に及ぼす影響

[0079] [表13]

	アセトン量 ( $\mu$ L)			
	125	250	500	1000
上清中のTE量 (%)	72	85	82	82
粒径 (nm)	210	170	130	130

エナント酸テストステロン(TE):5mg、ミリスチン酸:0.5mg、Tween80:2mg

[0080] 表11～13に示した結果より、Tween80と薬物との混合比、ミリスチン酸と薬物との混合比およびアセトンの使用量が、粒子の形成(粒径、エナント酸テストステロンの含有量)に大きく影響を及ぼすことが判明した。また、Tween80の量が多いほどエナント酸テストステロンの含有量が増加し、ミリスチン酸の量が多いほどエナント酸テストステロンの含有量が減少し、アセトンの使用量が多いほど粒径が小さくなることが判明した。

[0081] 実施例10:水溶性薬物(リン酸ベタメサゾン)の三次ナノ粒子の作製

リン酸ベタメサゾン10mgを溶解した500  $\mu$ Lの水中に、0.5M酢酸亜鉛水溶液1000  $\mu$ Lを添加した。12,000rpm/5分間遠心し、上清を除去後、沈殿に水を添加し遠心することで沈殿を洗浄した。この沈殿と1mgのミリスチン酸及びTween80をアセトン1000  $\mu$ L中に溶解(または懸濁)し、水中に添加攪拌することで、一次ナノ粒子を得た。この粒子懸濁液中に1M塩化カルシウム水溶液(ミリスチン酸に対し等モル量)を添加し30分攪拌後、1M炭酸水素ナトリウム(カルシウムに対し0.2倍モル量)を添加し1時間～12時間攪拌し、リン酸ベタメサゾンを含む三次ナノ粒子を作製した。Tween80の量を変え調製し、5,000rpmで5分間遠心後、上清の粒子の粒径、およびリン酸ベタメサゾン(BP)残量をHPLCにより測定した。その結果を表14に示した。

[0082] Tween量が粒子形成に及ぼす影響

[0083] [表14]

	Tween80/BP (重量比)				
	0	0.2	0.4	0.6	1.0
上清中のBP量 (%)	20	77	83	78	88
粒径 (nm)	ND	315	293	225	165

リン酸ベタメサゾン(BP):10mg、ミリスチン酸:1mg、アセトン:1000  $\mu$ L

ND:測定せず

[0084] 表14に示した結果から、Tween80を混合しないで調製した場合には、凝集塊が形成され上清中にBPはほとんど検出されなかった。Tween80量を混合させることで分散安定性の高い粒子が調製され、その量を多くするほど小さな粒子が調製できることがわかった。

[0085] 実施例11:レチノール(ビタミンA)粒子の作製

レチノール(ビタミンA)6mgを溶解したエタノールまたはアセトン溶液10  $\mu$ Lと大豆油100mgを混合し、グリセリン22mg、レシチン10mg、オレイン酸ナトリウム10mgおよびオレイン酸-ポリエチレングリコール共重合体12mgの水懸濁液中に添加し、総量で10mLとなるようにした。この混合液を超音波発生器またはフレンチプレッシャーを用いて均一化して、レチノール含有の一次ナノ粒子を作製した。次いで、オレイン酸ナトリウムに対し等モル量の塩化カルシウム水溶液を添加し、室温で1時間攪拌することにより二次ナノ粒子を作製した。次いで、塩化カルシウムに対し0.2〜1倍モル量の炭酸水素ナトリウムを添加し、3時間から一晩攪拌し、三次ナノ粒子を得た。最終的にレチノールの濃度は、0.3〜0.5%程度であった。

[0086] 実施例12:レチノール(ビタミンA)粒子の作製

水100重量部にオレイン酸ナトリウム0.5重量部を加え、オレイン酸ナトリウムが完全に溶解するまでスターラーにて攪拌した。一方、別にエタノール5.0重量部とレチノール50C(BASF社製:49%ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート(Tween20);47%レチノール;3%ブチルヒドロキシトルエン;1%ブチルヒドロキシアニソールの混合原料)5.0重量部とを混合・溶解させておき、先の溶液に添加し、混合液を10分間スターラーで攪拌し、一時ナノ粒子を作成した。次いで、1M塩化カルシウ

ム水溶液を0.25重量部加え、室温にて10分間スターで攪拌することにより二次ナノ粒子を作製した。次いで、1Mの炭酸水素ナトリウム水溶液を0.05重量部添加し、一晚攪拌し、三次ナノ粒子を得た。上記で得たナノ粒子の粒径は約100nmであった。

[0087] 実施例13: ユビデカレノン粒子の作製

大豆油1gに、50mg/mLのユビデカレノン-アセトン溶液200  $\mu$ Lを加えて攪拌、溶解させた。この溶液に25mg/mLのレシチン水溶液4mLを加え攪拌した。さらに100mg/mLのオレイン酸ナトリウム1mL、60mg/mLのOleyl-O-PEG (SUNBRIGHT OE-020; 日本油脂社製) 2mL、50%グリセリン水溶液440  $\mu$ L、精製水を加えて全量を10mLとした。攪拌後、超音波発生器(UD-201; トミー精工社製)を用いて乳化処理して粒子液を作製した。その後、1M塩化カルシウム水溶液330  $\mu$ Lを加えて45分間回転混和し、さらに1M炭酸水素ナトリウム水溶液330  $\mu$ Lを加えて45分間回転混和した。その後、遠心分離により過剰な金属塩および分離油脂層を除き、ユビデカレノンの三次ナノ粒子を得た。

この粒子の粒子径を粒径アナライザーFRAR-1000(大塚電子社製)を用いて測定したところ、平均粒子径は276.6nmであった。

また、乳化処理をフレンチプレス細胞破碎機(OMFA078A; Thermo IEC)で行っても同様にナノ粒子を作製することができた。

こうして得られたユビデカレノンの三次ナノ粒子を50°C、5日間、非遮光で放置したところ、粒子の外観、粒径とも変化を示さなかった。

[0088] 実施例14: 軟膏剤/ハイドロゲル剤の製造

実施例5で得られた三次ナノ粒子(エナント酸テストステロン封入)、白色ワセリン、カルボキシメチルセルロースナトリウムおよびパラオキシ安息香酸メチルを適宜使用して、全量が均質になるまで混和し、軟膏剤およびハイドロゲル剤とした。

[0089] 実施例15: ゲル剤

処方: ハイドロゲル剤として100重量部中

ポリビニルピロリドン(コリドン90F) 0.2重量部

エデト酸二ナトリウム 0.1重量部

ポリビニルアルコール(PVA)	1.5重量部
ベンザルコニウムクロリド	0.01重量部
実施例12で得られた三次ナノ粒子	0.1重量部
脱イオン水	残部

上記配合成分によりゲル剤を得た。

[0090] 実施例16:外用貼付剤(水性パップ剤)

処方:

実施例5で得られた三次ナノ粒子 (エナント酸テストステロン封入)	0.1重量部
ポリアクリル酸	2.0重量部
ポリアクリル酸ナトリウム	5.0重量部
カルボキシメチルセルロースナトリウム	2.0重量部
ゼラチン	2.0重量部
ポリビニルアルコール	0.5重量部
グリセリン	25.0重量部
カオリン	1.0重量部
水酸化アルミニウム	0.6重量部
酒石酸	0.4重量部
EDTA-2-ナトリウム	0.1重量部
精製水	残部

上記配合成分をベースとし、常法により外用剤(水性パップ剤)を得た。

[0091] 実施例17:注射剤

実施例5で得られた三次ナノ粒子(シクロスポリンA封入)を注射用蒸留水に溶解し、等張化剤を含有させ、さらにpHを6.9に調整した後、バイアル充填し、高温高压滅菌を行い、注射剤を得た。

産業上の利用可能性

[0092] 以上のように、本発明は、脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物を含有する一次ナノ粒子を2価または3価の金属塩を作用させることから成る薬物含有ナノ粒

子(二次ナノ粒子)、および脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物を含有する一次ナノ粒子を2価または3価の金属塩と作用させることにより二次ナノ粒子とし、当該二次ナノ粒子に1価ないし3価の塩基性塩を作用させることから成る薬物含有ナノ粒子(三次ナノ粒子)、ならびにそれらのナノ粒子の製造方法、さらにそれらのナノ粒子を含有する皮膚または粘膜適用型外用剤および注射用剤である。本発明のナノ粒子は、これまで十分に達成されていなかった脂溶性薬物、水溶性薬物の経皮または経粘膜による生体内吸収を可能にする画期的な効果を有し、高吸収性、徐放性、安定性のある脂溶性・水溶性薬物を含有する外用剤、注射剤である。



## 請求の範囲

- [1] 脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物を含有する一次ナノ粒子を、2価または3価の金属塩と作用させることからなる薬物含有ナノ粒子。
- [2] 脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物を含有する一次ナノ粒子を、2価または3価の金属塩と作用させることにより二次ナノ粒子とし、当該二次ナノ粒子に1価ないし3価の塩基性塩を作用させることからなる薬物含有ナノ粒子。
- [3] 一次ナノ粒子が、脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物、陰イオン残基を持つ中長鎖有機化合物および界面活性剤とを作用させることにより作製されることからなる請求項1または2に記載の薬物含有ナノ粒子。
- [4] 陰イオン残基を持つ中長鎖有機化合物が、炭素数6〜24の脂肪酸またはその塩である請求項3に記載の薬物含有ナノ粒子。
- [5] 炭素数6〜24の脂肪酸が、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸などの不飽和脂肪酸；ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸などの飽和脂肪酸から選択されるものである請求項4に記載の薬物含有ナノ粒子。
- [6] 2価または3価の金属塩が、カルシウム塩、亜鉛塩、鉄塩または銅塩である請求項1または2に記載の薬物含有ナノ粒子。
- [7] 1価ないし3価の塩基性塩が、炭酸水素塩、リン酸水素塩、炭酸塩、リン酸塩、シュウ酸塩、乳酸塩および尿酸塩から選択されるものである請求項2に記載の薬物含有ナノ粒子。
- [8] 水溶性薬物の脂溶性化が、水溶性薬物と2価または3価の金属イオンとの接触、水溶性薬物と酸性または塩基性多糖体との接触、水溶性薬物を溶解した溶液のpHの調整またはイオン強度の変化のいずれかの手段により行われる請求項1または2に記載の薬物含有ナノ粒子。
- [9] 水溶性薬物と接触させる2価または3価の金属イオンが、亜鉛イオン、カルシウムイオン、鉄イオンおよび銅イオンから選択されるものである請求項8に記載の薬物含有ナノ粒子。
- [10] 界面活性剤が、グリセリン、レシチン、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレート(Tween80)、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート(Tween20)、ポリオキ

シエチレン(20)ソルビタンモノステアレート(Tween60)、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノパルミテート(Tween40)、ポリオキシエチレン(20)ソルビタントリオレート(Tween85)、ポリオキシエチレン(8)オクチルフエニルエーテル、ポリオキシエチレン(20)コレステロールエステル、脂質-ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油および脂肪酸-ポリエチレングリコール共重合体から選択される1種または2種以上のものである請求項3に記載の薬物含有ナノ粒子。

- [11] 脂溶性薬物または水溶性薬物が、分子量が1000以下であって生理活性を有し、かつヒトに投与することができる化学物質である請求項1〜10のいずれかに記載の薬物含有ナノ粒子。
- [12] 脂溶性薬物が、水に対して溶けにくい〜ほとんど溶けないの範囲の溶解性であって、かつ有機溶媒に溶ける薬物である請求項11に記載の薬物含有ナノ粒子。
- [13] 脂溶性薬物が、ステロイドホルモン、免疫抑制・調節薬、抗癌薬、抗生物質、化学療法薬、抗ウイルス薬、非ステロイド性抗炎症薬、抗精神病薬、カルシウム拮抗薬、降圧薬、プロスタグランジン系薬および脂溶性ビタミンから選択されるものである請求項11または12に記載の薬物含有ナノ粒子。
- [14] 脂溶性薬物が、エナント酸テストステロン、プロピオン酸テストステロン、テストステロン、エストラジオール、吉草酸エストラジオール、安息香酸エストラジオール、酢酸デキサメタゾン、ベタメタゾン、ジプロピオン酸ベタメタゾン、吉草酸ベタメタゾン、酢酸プレドニゾン、シクロスポリン、タクロリムス、パクリタキセル、塩酸イリノテカン、シスプラチン、メソトレキセート、カルモフル、テガフル、ドキシソルビシン、クラリスロマイシン、アズトレオナム、セフニジル、ナリジクス酸、オフロキサシン、ノルフロキサシン、ケトプロフェン、フルルビプロフェン、フルルビプロフェンアキセチル、クロルプロマジン、ジアゼパム、ニフェジピン、塩酸ニカルジピン、ベシル酸アムロジピン、カンデサルタンシレキセチル、アシクロビル、ビダラビン、エファビレンツ、アルプロスタジル、ジノプロストン、ユビデカレノン、ビタミンA(レチノール)、ビタミンD、ビタミンEおよびビタミンKから選択されるものである請求項10〜13のいずれかに記載の薬物含有ナノ粒子。
- [15] 水溶性薬物が、2価または3価の金属イオンと結合して脂溶性化される薬物である請求項11に記載の薬物含有ナノ粒子。

- [16] 水溶性薬物が、水溶性のステロイドホルモン、免疫抑制・調節薬、抗癌薬、抗生物質、化学療法薬、抗ウイルス薬、非ステロイド性抗炎症薬、抗精神病薬、降圧薬、プロスタグランジン系薬およびビタミンから選択されるものである請求項11または15に記載の薬物含有ナノ粒子。
- [17] 水溶性薬物が、リン酸ベタメサゾン、リン酸デキサメタゾン、リン酸プレドニゾロン、コハク酸プレドニゾロン、コハク酸ヒドロコルチゾン、バンコマイシン、ビンクリスチン、ビンプラスチン、コハク酸クロラムフェニコール、ラタモキシセフ、セフピロム、カルモナム、リン酸クリンダマイシンおよびアバカビルから選択されるものである請求項11、15または16のいずれかに記載の薬物含有ナノ粒子。
- [18] 脂溶性薬物が、エナント酸テストステロン、シクロスポリン、吉草酸ベタメタゾン、ユビデカレノン、ビタミンA(レチノール)であり、水溶性薬物がリン酸ベタメサゾンである請求項11に記載の薬物含有ナノ粒子。
- [19] 粒子の直径が1〜200nmである請求項1〜18のいずれかに記載の薬物含有ナノ粒子。
- [20] 請求項1〜19のいずれかに記載の薬物含有ナノ粒子を含有する皮膚または粘膜適用型外用剤。
- [21] 外用剤が軟膏剤、ゲル剤、舌下錠、口腔錠剤、液剤、口腔・下気道用噴霧剤、吸引剤、懸濁剤、ハイドロゲル剤、ローション剤、パップ剤および貼付剤から選択される請求項20に記載の外用剤。
- [22] 請求項1〜19のいずれかに記載の薬物含有ナノ粒子を含有する注射用剤。
- [23] 脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物、陰イオン残基を持つ中長鎖有機化合物および界面活性剤を有機溶媒または含水有機溶媒に溶解し、この溶液を水に分散させることにより一次ナノ粒子を作製し、当該一次ナノ粒子含有溶液に2または3価の金属塩を作用させることを特徴とする薬物含有ナノ粒子の製造方法。
- [24] 脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物、陰イオン残基を持つ中長鎖有機化合物および界面活性剤を有機溶媒または含水有機溶媒に溶解し、この溶液を水に分散させることにより一次ナノ粒子を作製し、当該一次ナノ粒子含有溶液に2または3価の金属塩を作用させることにより二次ナノ粒子を作製し、当該二次ナノ粒子に

1価ないし3価の塩基性塩を作用させることを特徴とする薬物含有ナノ粒子の製造方法。

- [25] 有機溶媒が、アセトン、エタノール、プロパノールおよびブタノールから選択される1種または2種以上である請求項23または24に記載の製造方法。
- [26] 水溶性薬物の脂溶性化が、水溶性薬物と2価または3価の金属イオンと接触させることにより行う請求項23または24に記載の製造方法。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015026

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K9/14, 9/06, 9/08, 9/10, 9/20, 9/70, 9/72, 47/02, 47/04, 47/10, 47/12, 47/24, 47/34, 47/36, 31/07, 31/122, 31/198, A61P3/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K9/14, 9/06, 9/08, 9/10, 9/20, 9/70, 9/72, 47/02, 47/04, 47/10, 47/12, 47/24, 47/34, 47/36, 31/07, 31/122, 31/198, A61P3/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2002/051390 A2 (ARES TRADING S.A.), 04 July, 2002 (04.07.02), Particularly, page 1, line 9 to page 4, line 2; page 9, lines 13 to 18; page 2, lines 8 to 15 & EP 1345597 A2	2-26
Y	JP 2002-504425 A (LABORATOIRES SEROBIOLOGIQUES (SOCIETE ANONYME)), 12 February, 2002 (12.02.02), Particularly, Claims 1, 6; Par Nos. [0013] to [0014], [0024] & WO 99/043426 A1 & EP 1060011 A1 & US 2003/0180235 A1	2-26

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
13 January, 2005 (13.01.05)

Date of mailing of the international search report  
15 February, 2005 (15.02.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015026

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Sadasuke OKANO, "Shin· Yakuzaigaku Soron (Kaitei Dai 3 Han), Nankodo Co., Ltd., 10 April, 1987 (10.04.87), pages 65 to 66, particularly, page 66, table 2.7	2-26
Y	JP 5-507685 A (Haynes, Duncan H.), 04 November, 1993 (04.11.93), Page 3, lower right column & WO 91/016068 A & US 5091187 A & EP 533690 A1	2-26
Y	JP 2002-544177 A (PHARMASOL GmbH), 24 December, 2002 (24.12.02), Par Nos. [0001] to [0002] & WO 2002/067800 A2 & EP 1176984 A2	2-26
Y	Yoko YAMAGUCHI, Mitsuko TAKENAGA, Natsumi NAKAMURA, Yu MIZUSHIMA, Rie IGARASHI, "All-trans Retinoic Acid (ATRA) - CaC03 Nano-particle no Johosei no Kento", Nippon Yakuzai Gakkai Dai 17 Nenkai Koen Yoshishu, 27 March, 2002 (27.03.02), page 88, all references	2-26
Y	JP 2003-292420 A (L'Oreal), 15 October, 2003 (15.10.03), Par Nos. [0002] to [0004] & EP 1342471 A1	2-26
Y	JP 8-217691 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 27 August, 1996 (27.08.96), Par No. [0009] & WO 96/007399 A1 & EP 779806 A1 & US 6087324 A	2-26

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015026

### <Subject of search>

Claims 1 to 26 are directed to nanoparticles (C) obtained by causing a divalent or trivalent metal salt (B1) or both of salt (B1) and a monovalent to trivalent basic salt (B2) to act on primary nanoparticles (A) containing a fat-soluble drug.

However, with respect to the structure of nanoparticles (C) and the form of action of salts (B1) and (B2) on nanoparticles (A), nothing is described in the claims. Thus, an extremely wide variety of particles can be covered by the claims. However, upon reviewing of the description, it only appears that nanoparticles (C) wherein nanoparticles (A) are coated with a reaction product of salts (B1) and (B2) are described in Example 6, and there is no other place describing the structure of nanoparticles (C) and the form of action of salts (B1) and (B2) on nanoparticles (A).

Moreover, with respect to the nanoparticles (A) as well, although claim 3 and subsequent claims are drafted so as to limit the same to those produced by effecting action of a fat-soluble drug, an anionic residue having middle or long chain organic compound and a surfactant, there is no other description regarding the structure of nanoparticles (A) in the claims and an extremely wide variety of particles are covered thereby. However, in the description, it only appears that nanoparticles (A) resulting from intake of a fat-soluble drug in a micelle of anionic residue having middle or long chain organic compound are described in Examples, and there is no other description specifying the structure of nanoparticles (A), etc.

Therefore, the subject of the invention is unclear from the recitation made in these claims, and the contents of the description are not drafted clearly and fully to such an extent that persons skilled in the art to which the invention pertains cannot carry out the same, and the invention of these claims cannot be stated as being fully supported by the description (PCT Article 5 and PCT Article 6).

In the present invention, as the description of the descriptive portion and claims fails to satisfy the prescribed requirements as aforementioned, it is to be noted that in the international search, the subject of the prior art search has been limited to rational scope based on the description of the descriptive portion.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. A61K9/14, 9/06, 9/08, 9/10, 9/20, 9/70, 9/72, 47/02, 47/04, 47/10, 47/12, 47/24, 47/34, 47/36, 31/07, 31/122, 31/198, A61P3/02		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. A61K9/14, 9/06, 9/08, 9/10, 9/20, 9/70, 9/72, 47/02, 47/04, 47/10, 47/12, 47/24, 47/34, 47/36, 31/07, 31/122, 31/198, A61P3/02		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 2002/051390 A2 (ARES TRADING S.A.) 2002.07.04 特に、第1頁第9行~第4頁第2行、第9頁第13行~第18行、 第2頁第8行~第15行など & EP 1345597 A2	2-26
Y	JP 2002-504425 A (ラボラトワール・セロピオロジック (ソシエ テ・アノニム)) 2002.02.12 特に、特許請求の範囲1、6、[0013]-[0014]、[0024]など & WO 99/043426 A1 & EP 1060011 A1 & US 2003/0180235 A1	2-26
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 13.01.2005	国際調査報告の発送日 15.02.2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 福井 美穂	4P 3337
電話番号 03-3581-1101 内線 3492		



C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	岡野定舗、新・薬剤学総論（改訂第3版）、株式会社 南江堂、 1987. 04. 10、p. 65-66 特に、第66頁の表2. 7など	2-26
Y	JP 5-507685 A（ハynes、ダンカン・エイチ）1993. 11. 04 第3頁右下欄 & WO 91/016068 A & US 5091187 A & EP 533690 A1	2-26
Y	JP 2002-544177 A（ファルマソル ゲーエムベーパー） 2002. 12. 24 [0001]-[0002] & WO 2002/067800 A2 & EP 1176984 A2	2-26
Y	山口葉子、武永美津子、中村なつみ、水島裕、五十嵐理恵 All-trans レチノイン酸(ATRA) - CaCO <sub>3</sub> ナノパーティクルの徐放性 の検討、日本薬剤学会第17年会講演要旨集、2002. 03. 27、p. 88 全文献	2-26
Y	JP 2003-292420 A（ロレアル）2003. 10. 15 [0002]-[0004] & EP 1342471 A1	2-26
Y	JP 8-217691 A（武田薬品株式会社）1996. 08. 27 [0009] & WO 96/007399 A1 & EP 779806 A1 & US 6087324 A	2-26

<調査の対象について>

請求の範囲 1～26 は、脂溶性薬物を含有する一次ナノ粒子(A)に、2価または3価の金属塩(B1)、もしくは、(B1)と1価ないし3価の塩基性塩(B2)の両方を作用させてなるナノ粒子(C)である。

しかしながら、(C)の構造や、(A)に対する(B1)や(B2)の作用形態に関しては、上記請求の範囲には何ら記載されておらず、著しく多くの種類の粒子がこれに包含されうるにも関わらず、明細書を見ても、実施例6に(A)を(B1)と(B2)の反応物が被覆している(C)が記載されていると認められるのみで、他に(C)の構造や、(A)に対する(B1)や(B2)の作用形態が記載されている箇所はない。

また、(A)に関しても、請求の範囲3以降では、脂溶性薬物と陰イオン残基を持つ中長鎖有機化合物と界面活性剤を作用させて作製されるものに限定するよう記載されているものの、請求の範囲には他に(A)の構造に関する記載はなく、著しく多くの種類の粒子がこれに包含されうる。それにも関わらず、明細書には、実施例に陰イオン残基を持つ中長鎖有機化合物からなるミセルに脂溶性薬物を取り込まれてなる(A)が記載されていると認められるのみで、他に(A)の構造などを限定する記載はない。

してみれば、これらの請求の範囲の記載では、発明の内容が不明確であり、かつ、明細書の記載が当業者が当該発明を実施することができる程度に明確かつ十分に記載されておらず、これらの請求の範囲に係る発明が明細書により十分な裏付けがなされたものであるともいえない(PCT第5条、及びPCT第6条)。

そして、本願発明は、上述のように明細書及び請求の範囲の記載が所定の要件を満足しないものであるため、国際調査に際しては、明細書の記載から見て合理的な範囲のみを先行技術調査の対象としている点に留意されたい。